

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

Nucleotide sequences derived from the genomes of the retroviruses HIV-1, HIV-2 and SIV, and their application to the amplification of these viral genomes and to the in vitro diagnosis of infections resulting from these viruses

Patent Number: EP0806484

Publication date: 1997-11-12

Inventor(s): MONCANY MAURICE (FR); MONTAGNIER LUC (FR)

Applicant(s):: INST NAT SANTE RECH MED (FR); PASTEUR INSTITUT (FR)

Requested Patent: EP0806484, A3

Application Number: EP19970110543 19900605

Priority Number (s): EP19900401520 19900605; FR19890007354 19890602; FR19890012371 19890920

IPC Classification: C12Q1/70 ; C12Q1/68 ; A61K39/21 ; C07K16/10 ; G01N33/577 ; G01N33/569 ; A61K31/70 ; A61K39/42 ; C12N15/49

EC Classification: C12Q1/70B2B, C07K14/155

Equivalents:

Abstract

Oligonucleotides useful as primers for nucleic acid amplification comprise conserved sequences of the gag, vpr, pol or vpu genes of HIV-1 Bru, HIV-1 Mal, HIV-1 Eli, HIV-2 ROD and SIV MAC or the nef2, vif2 or vpx genes of HIV-2 ROD and SIV MAC.

Data supplied from the esp@cenet database - I2



(19)

Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11)

EP 0 806 484 A2

(12)

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(43) Date de publication:
12.11.1997 Bulletin 1997/46

(51) Int. Cl.⁶: C12Q 1/70, C12Q 1/68,
A61K 39/21, C07K 16/10,
G01N 33/577, G01N 33/569,
A61K 31/70, A61K 39/42
// C12N15/49

(84) Etats contractants désignés:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(30) Priorité: 02.06.1989 FR 8907354
20.09.1989 FR 8912371

(62) Numéro(s) de document de la (des) demande(s)
initiale(s) en application de l'article 76 CBE:
90401520.3 / 0 403 333

(71) Demandeurs:
• INSTITUT PASTEUR
75724 Paris Cédex 15 (FR)
• INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (INSERM)
75654 Paris Cédex 13 (FR)

(72) Inventeurs:
• Moncany, Maurice
75019 Paris (FR)
• Montagnier, Luc
92350 Le Plessis-Robinson (FR)

(74) Mandataire: Desalix, Anne et al
Ernest Gutmann - Yves Plasseraud S.A.
3, rue Chauveau-Lagarde
75008 Paris (FR)

Remarques:

Cette demande a été déposée le 27 - 06 - 1997
comme demande divisionnaire de la demande
mentionnée sous le code INID 62.

(54) Séquences nucléotidiques issues du genome des rétrovirus du type hiv-1, hiv-2 et siv, et
leurs applications notamment pour l'amplification des genomes de ces rétrovirus et pour le
diagnostic *In vitro* des infections dues à ces virus

(57) L'invention concerne un oligonucléotide utilisable en tant qu'amorce pour l'amplification de séquences d'acide nucléique, caractérisé en ce que sa séquence est choisie parmi les séquences conservées et spécifiques des gènes gag, vor, pol ou vpu des virus HIV-1 Bru, HIV-1 Mal, et HIV-1 Eli HIV-2 ROD et SIV MAC, ou dans les gènes nef2, yif2 et ypx des virus HIV-2 ROD et SIV MAC, ou parmi les séquences complémentaires de ces dernières.

EP 0 806 484 A2

Description

La présente invention est relative à des séquences oligonucléotidiques utilisables pour la mise en oeuvre de techniques d'amplification de séquences nucléiques spécifiques de rétrovirus d'immunodéficience humaine du type HIV ou de rétrovirus d'immunodéficience du singe du type SIV.

5 L'invention concerne en particulier l'application de ces séquences à des méthodes de diagnostic *in vitro* chez l'homme de l'infection d'un individu par un rétrovirus du type HIV (actuellement HIV-1 et/ou HIV-2).

L'isolement et la caractérisation de rétrovirus regroupés sous les désignations HIV-1 et HIV-2 ont été décrits dans les demandes de brevet européen n° 85/905.513.9 et n° 87/400.151.4 respectivement. Ces rétrovirus ont été isolés 10 chez plusieurs malades présentant des symptômes d'une lymphadénopathie ou d'un Syndrome d'Immunodeficiency Acquise (SIDA).

Les rétrovirus du type HIV-2 comme les rétrovirus du type HIV-1, se caractérisent par un tropisme pour les lymphocytes T4 humains et par un effet cytopathogène à l'égard de ces lymphocytes lorsqu'ils s'y multiplient, pour alors causer entre autres des polyadénopathies généralisées et persistantes, ou un SIDA.

15 Un autre rétrovirus, dénommé SIV-1, cette dénomination remplaçant la dénomination antérieurement connue STLV-III, a été isolé chez le singe macaque rhésus (M.D. DANIEL et al. Science, 228, 1201 (1985) ; N.L. LETWIN et al, Science, 230, 71 (1985) sous l'appellation "STLV-III Mac").

Un autre rétrovirus, désigné "STLV-III_{AGM}", (ou SIV_{AGM}) a été isolé chez des singes verts sauvages. Mais contrairement aux virus présents chez le singe macaque rhésus, la présence de STLV-III_{AGM} ne semble pas induire une maladie du type SIDA chez le singe vert d'Afrique.

20 Pour la commodité du langage, ces virus ne seront plus désignés dans ce qui suit que par l'expression SIV (l'expression SIV est l'abréviation anglaise de "Simian Immunodeficiency Virus" (Virus d'immunodéficience du singe) éventuellement suivie d'une abréviation désignant l'espèce de singe dont ils sont issus par exemple "MAC" pour le macaque" ou "AGM" pour le singe vert d'Afrique (abréviation de "African Green Monkey").

25 Une souche du rétrovirus SIV-1 Mac a été déposée à la C.N.C.M le 7 février 1986 sous le n° I-521.

La poursuite de l'étude des rétrovirus HIV-1 et HIV-2 a également conduit à l'obtention de séquences d'ADN complémentaires (ADNc) des ARN de leur génome. La séquence nucléotidique complète d'un ADNc d'un rétrovirus représentatif de la classe HIV-2 (HIV-2 ROD) a été déposée le 21/02/1986 à la C.N.C.M. sous le n° I-522, sous le nom de référence LAV-2 ROD.

30 De même, la séquence nucléotidique complète d'un ADNc d'un rétrovirus représentatif de la classe HIV-1 est décrite par WAIN HOBSON, SONIGO, COLE, DANOS et ALIZON dans CELL (janvier 1985).

Egalement pour la commodité du langage, les virus du type HIV-1 et HIV-2 seront parfois désignés dans ce qui suit par l'expression HIV.

35 Les méthodes de diagnostic *in vitro* des infections par des virus du type HIV-1 ou HIV-2 existant actuellement, font appel à la détection d'anticorps ANTI-HIV-1 ou anti-HIV-2 éventuellement présents dans un prélèvement biologique (biopsie) ou dans un fluide biologique, par exemple dans un sérum obtenu, à partir du patient à l'étude, par mise en contact de ce fluide biologique avec des extraits ou antigènes d'HIV-1 ou d'HIV-2, dans des conditions permettant la production d'une réaction immunologique éventuelle de ces extraits ou antigènes avec ces anticorps.

40 De telles méthodes de diagnostic risquent d'être faussement négatives, en particulier dans le cas d'une infection récente d'un individu par les virus du type HIV.

Les techniques d'amplification génique sont d'un appoint considérable pour la mise au point de méthodes de diagnostic *in vitro* particulièrement sensibles de maladies virales. Parmi ces techniques d'amplification génique, on peut citer la technique PCR (Polymérase Chain Reaction) telle que décrite dans les demandes de brevet européen n° 86/302.298.4 du 27/03/1986 et n° 87/300.203.4 du 09/01/1987, ou encore la technique dite "Qβreplicase" décrite dans 45 Biotechnology, vol.6, page 1197 (octobre 1988) et celle procédant à l'aide d'une ARN polymérase (T7RNA polymérase) décrite dans la demande de brevet international n° WO89/01050. Ces techniques permettent d'améliorer la sensibilité de détection des acides nucléiques des virus, et nécessitent l'utilisation d'amorces de synthèse spécifiques.

Pour la recherche des virus du type HIV, le choix des amores est problématique. En effet, du fait de la grande variabilité des séquences de nucléotides du génome viral, une amorce conforme à la séquence connue d'un isolat 50 donné d'un virus du type HIV peut faillir à l'amplification de certains variants vitaux du type HIV. D'autre part, même si une amorce est choisie dans une région conservée du génome d'un virus HIV à un autre, son "bon fonctionnement" n'est pas pour autant assuré et peut donner lieu à de mauvais rendements d'amplification.

La présente invention fournit précisément des amores oligonucléotidiques permettant, entre autres, l'amplification, notamment à des fins diagnostiques, du génome de tous virus du type HIV et SIV, avec des rendements considérés comme maximum dans l'état actuel de la technique et surtout évitant la présence de nombreuses bandes aspécifiques.

55 Les amores de la présente invention sont à la fois spécifiques des virus du groupe HIV-1 et/ou des virus des groupes HIV-2 et SIV, et sont insensibles aux variations du génome de ces virus.

La présente invention a pour objet des amores oligonucléotidiques, d'environ 15 à 30 nucléotides, utilisables pour

EP 0 806 484 A2

l'amplification génomique des virus du type HIV-1 et/ou du type HIV-2 et SIV.

L'invention concerne toute séquence nucléotidique caractérisée en ce que sa séquence :

- soit est choisie parmi celles qui sont contenues dans l'une des séquences nucléotidiques comprises dans les gènes gag, vpr et pol des virus HIV-1 Bru, HIV-1 Mal, HIV-1 Eli, HIV-2 ROD et SIV MAC, ou dans les gènes nef2, vif2 et vpx des virus HIV-2 ROD, et SIV MAC, ou dans les gènes env, nef1, vif1 et vpr des virus HIV-1 Bru, HIV-1 Mal, et HIV-1 Eli, et plus particulièrement parmi celles qui sont contenues dans les enchaînements nucléotidiques définis ci-après,
- soit (notamment pour les séquences les plus longues) contient l'une des séquences nucléotidiques susdites issues de HIV-1 Bru, ou HIV-1 Mal, ou HIV-1 Eli ou HIV-2 ROD ou SIVMac , ou contient une séquence nucléotidique complémentaire de l'une de ces dernières séquences, étant entendu que les nucléotides supplémentaires éventuels qui "débordent" la séquence nucléotidique du genre en question, du côté des extrémités 3' ou 5', coincident de préférence avec ceux qui se trouvent placés en deçà des extrémités 5' ou 3' correspondant au sein même de la séquence complète des virus du type HIV-1, HIV-2 ou de SIV MAC, sus-mentionnées,
- soit, si cette séquence nucléotidique n'est pas identique à l'une des séquences nucléotidiques susdites, ou n'est pas complémentaire de l'une de ces séquences, est néanmoins susceptible de s'hybrider avec une séquence nucléotidique issue des virus HIV-1 Bru, HIV-1 Mal, HIV-1 Eli, et/ou avec une séquence nucléotidique issue du virus HIV-2 ROD ou SIV MAC sus-mentionnée. L'hybridation peut s'effectuer à une température de $60^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (de préférence $60^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$), préconisée pour un optimum de rendement.

La numérotation des nucléotides mentionnés ci-dessous correspond à celle utilisée dans le manuel de référence "Human Retrovirus and AIDS-1989" édité par le "Los Alamos National Laboratory- New Mexico - USA".

(Les séquences des virus HIV-1 Mal, HIV-1 Eli ont été décrites par MONTAGNIER, SONIGO, WAIN-HOBSON et ALIZON dans la demande de brevet européen n° 86.401380 du 23/06/86).

Les séquences de l'invention sont synthétisées sur synthétiseur commercialisé par Applied Biosystems (méthode phosphoro-amidites, ou sur tout autre appareil utilisant une méthode semblable).

L'invention concerne plus particulièrement les séquences oligonucléotidiques caractérisées par les enchaînements nucléotidiques suivants (représentés dans le sens 5' → 3'; les initiales "S" et "AS" indiquent si l'oligonucléotide est sens ou antisens, c'est-à-dire si l'oligonucléotide est orienté respectivement dans le sens 5' (O → 3' ou dans le sens 3' (O → 5') :

1^{re}) séquences communes aux génomes des virus HIV-1, HIV-2 et SIV (les séries de chiffres espacées d'un trait indiquent la position des nucléotides sur les génomes correspondant respectivement aux virus HIV-1 Bru, HIV-1 Mal, HIV-1 Eli, HIV-2 ROD et SIV) :

- séquences spécifiques du gène gag du génome des virus sus-mentionnés (gène codant pour un groupe d'anticorps spécifiques du nucléotide de ces virus).

Certaines variantes peuvent être apportées sur certaines positions des séquences nucléotidiques indiquées ci-dessous, sans que les propriétés d'hybridation de ces séquences nucléotidiques avec les gènes des virus du type HIV et/ou SIV soient affectées. Les séquences nucléotidiques comportant ces variantes sont représentées en-dessous des séquences nucléotidiques initiales dont elles dérivent par remplacement d'une ou plusieurs bases. Les bases modifiées par rapport à celles des séquences nucléotidiques initiales sont indiquées en toute lettre à la verticale des positions correspondant aux bases qui ont été remplacées dans ces séquences initiales ; tandis que les bases des séquences initiales qui n'ont pas été remplacées dans les séquences comportant ces variantes sont indiquées à l'aide de pointillés.

La synthèse des amorces se fait en utilisant toutes les variantes simultanément. C'est le mélange de toutes les variantes pour une séquence donnée qui est utilisé dans les tests.

50

55

EP 0 806 484 A2

MMy1 : TGG CGC CCG AAC AGG GAC
... .T.
5 S, 636-653, 635-652, 636-653, 859-876, 834-851

MMy2 : GGC CAG GGG GAA AGA AAA A
... .C. .C.
10A.
S, 854-872, 864-888, 848-872, 1160-1184, 1124-1148

MMy3 : TGC CCA TAC AAA ATG TTT TA
... ... C.. T.T
15 AS, 900-881, 916-897, 900-881, 1212-1193, 1176-1157

MMy4 : TGC ATG GCT GCT TGA TG
... .AC ..G ..
20 AS, 1385-1369, 1419-1403, 1385-1369, 1703-1687, 1667-1651

MMy4B : CTT TGC ATG GCT GCT TGA TG
..CAC ..G ..
25 AS, 1388-1369, 1421-1403, 1388-1369, 1706-1687,
1670-1651,

MMy4Bbis : CAT CAA GCA GCC ATG CAA AG
..C ..GTG ..
30 S, 1369-1388, 1403-1421, 1369-1388,
1687-1706, 1651-1670,

MMy28 : AGG GCT GTT GGA AAT GTG G
...G
35 S, 2021-2039, 2055-2073, 2024-2042, 2329-2349,
2299-2318,

40 MMy28bis : CCA CAT TTC CAG CAT CCC T
...G
...C
45 AS, 2039-2021, 2073-2055, 2042-2024, 2349-2329,
2318-2299

50 séquences spécifiques du gène vpr

MMy18 : GAT AGA TGG AAC AAG CCC CAG
55 S, 5590-5610, 5585-5605, 5554-5574, 6233-6296,
6147-6170,

EP 0 806 484 A2

**MMy19 : TCC ATT TCT TGC TCT CCT CTG T
AS, 5870-5849, 5865-5844, 5834-5813,
5 6551-6531, 6454-6431,**

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

MMy29 : TAA AGC CAG GAA TGG ATG GCC CAA
... A . . .
S, 2620-2643, 2615-2638, 2584-2607, 2971-2994,
2887-3010

MMy29bis : TTG GGC CAT CCA TTC CTG GCT TTA
... . T.
AS, 2643-2620, 2638-2615, 2607-2584, 2994-2971,
3010-2887,

MMy30 : TGG ACT GTC AAT GAC ATA CAG AA
... T
S, 3339-3361, 3334-3356, 3303-3325, 3690-3712,
3606-3628,

MMy30bis : TTC TGT ATG TCA TTG ACA GTC CA
... T
AS, 3361-3339, 3356-3334, 3325-3303, 3712-3690,
3628-3606,

MMy31 : CAT GGG TAC CAG CAC ACA AAG G
S, 4186-4207, 4181-4202, 4150-4171, 4534-4555,
4450-4471,

MMy31bis : CCT TTG TGT GCT GGT ACC CAT G
AS, 4207-4186, 4202-4181, 4171-4150, 4555-4534,
4471-4450,

MMy32 : TGG AAA GGT GAA GGG GCA GT
... A
S, 4992-5011, 4987-5006, 4956-4975, 5340-5359,
5256-5275,

MMy32bis : ACT GCC CCT TCA CCT TTC CA
... T
... C
AS, 5011-4992, 5006-4987, 4975-4956, 5359-5340,
5275-5256

2°) séquences communes aux génomes des virus HIV-2 et SIV (les séries de chiffres espacées d'un trait indiquent

55 la position des nucléotides sur les génomes correspondant respectivement aux virus séquences spécifiques du gène nef2 (codant pour un facteur néositif de 27 kD).

5 **MMy12 : AGA GAC TCT TGC GGG CGC GTG**
 S, 9165-9185, 9139-9159,
MMy13 : ATA TAC TTA GAA AAG GAA GAA GG
 S, 9542-9564, 9516-9538,
10 **MMy13bis : CCT TCT TCC TTT TCT AAG TAT AT**
 AS, 9564-9542, 9538-9516,
MMy14 : AGC TGA GAC AGC AGG GAC TTT CCA
 AS, 9956-9933, 9893-9870,

15

 séquences spécifiques du gène *vif2* (codant pour un facteur d'infectiosité de 23 kD)

20 **MMy20 : TAT GGA GGA GGA AAA GAG ATG GAT AGT**
 S, 5424-5450, 5340-5366,
MMy21 : TAG CAC TTA TTT CCC TTG CTT T
 S, 5754-5775, 5670-5691,
25 **MMy21bis : AAA GCA AGG GAA ATA AGT GCT A**
 AS, 5775-5754, 5691-5670,
MMy22 : CCC TTG TTC ATC ATG CCA GTA T
 AS, 6082-6061, 5995-5974,

35

 séquences spécifiques du gène *vpx* (codant pour une protéine de 12 kD)

40 **MMy23 : ATG TCA GAT CCC AGG GAG A**
 S, 5900-5918, 5813-5831,
MMy24 : CCT GGA GGG GGA GGA GGA GGA
45 **AS, 6228-6208, 6141-6121,**

50

 3 °) Séquences communes aux génomes des virus HIV-1 Bru, HIV-1 Mai, et HIV-1 Eli (les séries de chiffres espacées d'un trait indiquent la position des nucléotides sur les génomes correspondant respectivement aux virus HIV-1 Bru, HIV-1 MAI et HIV-1 Eli).

55

 séquences spécifiques du gène *env* (codant pour les protéines d'enveloppe)

MMy5 : CCA ATT CCC ATA CAT TAT TGT GCC CC
S, 6905-6930, 6903-6928, 6860-6885
5 MMy5bis : GGG GCA CAA TAA TGT ATG GGA ATT GG
AS, 6930-6905, 6928-6903, 6885-6860,
MMy6 : AAT GGC AGT CTA GCA GAA GAA GA
10 S, 7055-7077, 7053-7075, 7010-7032
MMy7 : ATC CTC AGG AGG GGA CCC AGA AAT T
S, 7360-7384, 7349-7373, 7306-7330
15 MMy7bis : AAT TTC TGG GTC CCC TCC TGA GGA T
AS, 7384-7360, 7373-7349, 7330-7306
MMy8 : GTG CTT CCT GCT GCT CCC AAG AAC CC
20 AS, 7857-7832, 7846-7821, 7800-7775
MMy8bis : GGG TTC TTG GGA GCA GCA GGA AGC AC
S, 7832-7857, 7821-7846, 7775-7800,
MMy9 : ATG GGT GGC AAG TGG TCA AAA AGT AG
25 A
S, 8844-8869, 8836-8861, 8787-8812,
MMy9bis : CTA CTT TTT GAC CAC TTG CCA CCC AT
30 AS, 8869-8844, 8861-8836, 8812-8787,
MMy78 : TAT TAA CAA GAG ATG GTG G
S, 7629-7647, 7612-7630, 7572-7590,
35 MMy89 : CCA GCA AGA AAA GAA TGA A
S, 8224-8242, 8213-8231, 8167-8185,
MMy89bis : TTC ATT CTT TTC TTG CTG G
40 AS, 8242-8224, 8231-8213, 8185-8167,

45 séquences spécifiques du gène nef1
MMy10 : AAA AGA AAA GGG GGG ACT GGA
S, 9116-9136, 9117-9137, 9062-9082,
50 MMy10bis : TCC AGT CCC CCC TTT TCT TTT
AS, 9136-9116, 9137-9117, 9082-9062,

5
MMy11 : AAA GTC CCC AGC GGA AAG TCC C
AS, 9503-9483, 9505-9484, 9449-9428,

10 séquences spécifiques du gène vif 1

15 **MMy15 : GAT TAT GGA AAA CAG ATG GCA GGT GAT**
 S, 5073-5099, 5068-5094, 5037-5063,
 MMy16 : GCA GAC CAA CTA ATT CAT CTG TA
 S, 5383-5405, 5378-5400, 5347-5369,
 MMy16bis : TAC AGA TGA ATT AGT TGG TCT GC
 AS, 5405-5383, 5400-5378, 5369-5347,
20 **MMy17 : CTT AAG CTC CTC TAA AAG CTC TA**
 AS, 5675-5653, 5670-5648, 5639-5617,

25 séquences spécifiques du gène vpu

30 **MMy25 : GTA AGT AGT ACA TGT AAT GCA ACC T**
 S, 6081-6105, 6076-6100, 6045-6069,
 MMy26 : AGC AGA AGA CAG TGG CCA TGA GAG
 S, 6240-6263, 6238-6261, 6207-6230,
 MMy27 : ACT ACA GAT CAT CAA TAT CCC AA
 AS, 6343-6321, 6338-6316, 6307-6285,

40
45 L'invention a également pour objet les séquences (ou amores) possédant une structure nucléotidique complémentaire de celles des amores définies ci-dessus.

Elle concerne également les séquences nucléotidiques présentant certaines mutations par rapport à celles définies ci-dessus sans que les propriétés d'hybridation, telles que définies ci-dessus, de ces séquences soient modifiées. Le pourcentage de nucléotides différents de ceux constituant les séquences décrites ci-dessus, sans pour autant affecter les propriétés d'hybridation des séquences de l'invention, peut atteindre 40 %.

D'une manière générale, dans le cas d'une amorce (primer) sens (S), un plus grand nombre de mutations seront tolérées du côté 5' que du côté 3' de l'amorce, le côté 3' devant s'hybrider parfaitement avec un brin déterminé d'une séquence nucléotique pour permettre l'amplification de cette séquence. Dans le cas d'une amorce anti-sens (AS), la tolérance est permise du côté 3'.

L'invention a également pour objet les amores telles que définies ci-dessus et comportant une conservation d'au moins 5 bases de chaque côté, la partie médiane comportant des modifications, sans que les propriétés d'hybridation ci-dessus soient modifiées.

Une des caractéristiques des amores oligonucléotidiques de l'invention est de donner une bande d'amplification nette, dépourvue généralement de bandes aspécifiques lorsque les indications techniques d'utilisation décrites dans la présente invention sont mises en oeuvre. Ce fait est dû à la longueur des amores pouvant atteindre 27 bases ce qui accroît la spécificité d'hybridation, ainsi qu'aux conditions d'utilisation drastiques qui permettent d'éliminer les associa-

tions parasites. La spécificité pour chaque type de virus est fonction, outre du pourcentage d'homologie avec la matrice de référence, de la longueur des amores, qui peuvent atteindre, pour un rendement acceptable, jusqu'à 40 bases.

L'invention s'étend également aux amores telles que décrites ci-dessus liées au niveau de leur extrémité 5' à un promoteur pour la mise en oeuvre d'une méthode d'amplification génomique par synthèse de multiple copies d'ADN ou d'ARN telle que décrite dans la demande de brevet européenne n° 88/307.102.9 du 01/08/1988.

L'invention a notamment pour objet l'utilisation des amores décrites ci-dessus pour la mise en oeuvre d'un procédé d'amplification génique de séquences nucléiques de virus du type HIV-1 et/ou HIV-2, et/ou SIV, ce procédé étant applicable au diagnostic *in vitro* de l'infection potentielle d'un individu par un virus du type HIV-1 et/ou HIV-2 ou d'un animal par au moins l'un des trois virus (HIV-1, HIV-2, SIV).

Cette méthode de diagnostic *in vitro* de l'invention est réalisée à partir d'un échantillon biologique (par exemple un fluide biologique tel que le sérum, les lymphocytes du sang circulant) obtenu à partir d'un patient à l'étude, et comprend principalement les étapes suivantes :

- une étape d'extraction de l'acide nucléique à détecter appartenant au génome du virus du type HIV-1 et/ou HIV-2 et/ou SIV éventuellement présent dans l'échantillon biologique sus-mentionné, et, le cas échéant, une étape de traitement à l'aide d'une transcriptase inverse dudit acide nucléique si ce dernier est sous forme d'ARN afin d'obtenir un acide nucléique double brin (cette dernière étape étant encore désignée ci-dessous par étape de rétro-transcription de l'ARN viral),
- un cycle comprenant les étapes suivantes :

- 20 . dénaturation de l'acide nucléique double brin à détecter, ce qui conduit à la formation d'un acide nucléique simple brin,
- . hybridation de chacun des brins d'acide nucléique, obtenus lors de l'étape de dénaturation précédente, avec au moins une amorce selon l'invention, par mise en contact des brins sus-mentionnés avec au moins un couple d'amores selon l'invention dans les conditions d'hybridation définies ci-dessous,
- 25 . formation à partir des amores des ADN complémentaires aux brins sur lesquels elles sont hybridées en présence d'un agent de polymérisation (ADN polymérase) et de quatre nucléosides triphosphate (dNTP) différents, ce qui conduit à la formation d'un plus grand nombre d'acides nucléiques double brin à détecter qu'à l'étape de dénaturation précédente,

- 30 ce cycle étant répété un nombre de fois déterminé pour obtenir ladite séquence nucléique à détecter éventuellement présente dans l'échantillon biologique dans une proportion suffisante pour permettre sa détection,
- une étape de détection de la présence éventuelle de l'acide nucléique appartenant au génome du virus du type HIV-1 et/ou HIV-2 et/ou SIV dans l'échantillon biologique.

35 L'étape d'hybridation décrite ci-dessus est avantageusement réalisée à 60°C pendant 1 minute 30 secondes dans le tampon "10 X buffer" dont la composition (en concentration finale d'utilisation) est indiquée ci-dessous.

La méthode de diagnostic *in vitro* de l'invention peut être réalisée soit à partir de l'ARN viral, soit à partir de l'ADN complémentaire, épissomial ou intégré.

40 En effet, les génomes des virus HIV et SIV se présentent sous forme d'ARN ou d'ADN en fonction de la localisation du virus dans l'organisme.

Lorsque le virus est situé à l'intérieur des cellules de l'organisme, notamment à l'intérieur des cellules sanguines, son ARN est recopié en ADN par une transcriptase inverse. En revanche, le génome des virus du type HIV en milieu extracellulaire, notamment dans le sang, demeure sous forme d'ARN.

45 L'étape d'extraction selon l'invention de l'ADN viral contenu dans les cellules de l'échantillon biologique préconisée par les inventeurs - outre la méthode classique au phénol chloroforme - présente les étapes suivantes :

- . suspension du culot cellulaire dans 0,5 ml d'eau pyrolyisée dans un Potter gros piston,
- . broyage des cellules dit par "aller et retour",
- 50 . adjonction Triton X100 pour 1 concentration finale de 0,1 %,
- . dénaturation à la chaleur durant 15 à 25 minutes à 100°C,
- . centrifugation courte pour n'éliminer que les débris cellulaires,
- . précipitation de l'ADN durant la nuit à -20°C par adjonction de 2,5 volumes d'éthanol absolu et de 10 % du volume final d'acétate de sodium 3 Molaires. L'ADN est ensuite récupéré puis resuspendu dans l'eau pyrolyisée après avoir été lavé 2 fois par de l'éthanol à 70°. Il est à noter que cette méthode permet la précipitation conjointe des ADN et des ARN, ce qui autorise la détection du message génomique des virus de types HIV ou SIV par utilisation de la méthode dite "PCR directe ADN" ou par celle dite de "PCR-ARN".

L'étape d'extraction de l'ARN viral est généralement effectuée de manière classique connue de l'homme de l'Art.

EP 0 806 484 A2

Après extraction de l'ARN, une étape supplémentaire de transformation de l'ARN, monobrin en ADN double brin est nécessaire à effectuer lorsque le diagnostic *in vitro* de l'invention est réalisé à partir d'échantillons biologiques contenant les virus du type HIV-1 et/ou HIV-2 et/ou SIV dont les génomes sont sous forme d'ARN.

Cette transformation de l'ARN en ADN est réalisée par traitement de l'ARN obtenu après extraction de l'échantillon biologique, notamment du sérum, dans un milieu approprié à l'aide d'une transcriptase inverse.

L'invention a plus particulièrement entre autres pour objet une méthode de diagnostic *in vitro* telle que définie ci-dessus, dans laquelle l'étape de rétro-transcription de l'ARN viral est réalisée de la manière suivante :

- 10 µg d'ARN extrait resuspendu dans de l'eau est mis en présence du couple d'amorces à la concentration de 40 µM chacun, dans un volume final de 40 µl. L'ensemble est dénaturé à 100°C durant 10 minutes puis plongé dans de l'eau glacée,
- 10 rajoute 10 µl du mélange suivant : 5 µl du tampon "10 X buffer" décrit ci-dessous + 1 unité de reverse-transcriptase (d'AMV (Avian Myeloblastosis Virus) ou de MuMLV (Moloney Leukemia Virus)) + 1 unité de Tag-polymérase + 1 µl du mélange des 4 dNTP à 25 mM chacun + de l'eau Q.S.P. 10 µl. Le volume final est donc de 50 µl.

Cette réaction s'effectue en deux étapes :

- a) 1ère étape : fabrication de l'ADNc par action de la réverse transcriptase à 42°C durant 13 minutes,
- b) 2ème étape : amplification génique classique: on chauffe à 95°C durant 3 minutes pour détruire la réverse-transcriptase et permettre l'étape de déshybridation/hybridation, puis on démarre le cycle décrit précédemment pour l'amplification génique.

L'invention a plus particulièrement pour objet une méthode de diagnostic *in vitro* telle que décrite ci-dessus, dans laquelle l'étape de dénaturation est réalisée en présence du (ou des) couple(s) d'amorces (ou de primers) de l'invention. En effet, comme il a été précisé ci-dessus, une des caractéristiques des oligonucléotides (ou primers), de l'invention est de donner une bande d'amplification nette, dépourvue généralement de bandes aspécifiques, lorsqu'ils sont utilisés dans les conditions qui suivent :

- **hybridation** : les primers (1 µl d'une solution à 40 µmolaire (40 µM) de chaque primer) sont mis en présence de l'ADN-matrice (100 à 300 ng) pour la première étape de dénaturation-réassocation ; on chauffe, durant 10 minutes à 100°C puis on plonge les tubes contenant ce mélange d'ADN-matrice et de primers dans de l'eau contenant de la glace afin d'augmenter le taux de réassocation ADN-matrice/primers. Les primers doivent être utilisés à une concentration finale dans l'étape d'amplification qui suit de 0,8 µM chaque.
- **amplification** : on ajoute au milieu précédent les 4 A dNTP chacun étant utilisé à 0,5 µmolaire en solution finale (50 µl), et une unité de Taq-polymérase pour un milieu réactionnel de 50 µl ; cette étape est réalisée dans un tampon d'amplification de la présente invention, généralement désigné sous le nom de "10 X buffer" dont la composition (lorsqu'il est dilué au 1/10th) est la suivante : Tris-HCl, pH 8,9 : 50 mM ; (NH₄)₂ SO₄ : 15 mM ; MgCl₂ : 5 mM ; β-mercaptopéthanol : 10 mM ; gélatine : 0,25 mg/ml. On additionne 5 µl de ce tampon et de l'eau q.s.p. 50 µl au milieu précédent.

Les cycles d'amplification sont réalisés de la manière suivante : 30 à 40 cycles composés de :

- 94°C durant 10 secondes (dénaturation),
- 60°C durant 1 minute 30 (hybridation),
- 78°C durant 1 minute 30 (élongation).

Le tout sera suivi par un cycle unique à 78°C durant 15 minutes.

La précision des températures indiquées à ± 0,3°C près, ainsi que leur stabilité durant les différents cycles, représentent des conditions essentielles pour l'obtention des rendements maximum ainsi que l'absence de bandes aspécifiques.

La concentration optimale d'ADN est de 100 à 300 ng pour de l'ADN génomique extrait de cellules (de patients ou en culture, de mammifères ou autres).

Il va de soi que les conditions qui précèdent représentent des conditions optimales pour un milieu réactionnel final de 50 µl, et que ces conditions peuvent être modifiées en fonction du volume final du milieu réactionnel.

L'utilisation de plusieurs couples d'amorces différents (ou cocktails de couples) de l'invention permet soit la détection croisée de plusieurs types de virus du type HIV et/ou SIV, soit la détection simultanée de plusieurs gènes d'un même virus du type HIV et/ou SIV.

A titre d'exemple de couples d'amorces préférés utilisables dans le cadre de la présente invention, on peut citer les couples d'amorces suivants :

EP 0 806 484 A2

- MMy1-MMy4, MMy2-MMy4, MMy1-MMy3, MMy18-MMy19, MMy4bis-MMy28bis, MMy28-MMy29bis, MMy29-MMy30bis, MMy31-MMy32bis, notamment pour le diagnostic *in vitro* de l'infection d'un individu par HIV-1 et/ou HIV-2
- MMy5-MMy8, MMy6-MMy8, MMy7-MMy8, MMy5-MMy7bis, MMy6-MMy7bis, MMy9-MMy11, MMy10-My11, MMy9-MMy10bis, MMy26-MMy5bis, MMy8bis-MMy9bis, MMy8bis-MMy89, MMy89bis-MMy9bis, MMy15-MMy17, MMy15-MMy16bis, MMy16-MMy17, MMy25-MMy27, MMy26-MMy27, notamment pour le diagnostic *in vitro* de l'infection d'un individu par HIV-1,
- MMy20-MMy22, MMy20-MMy21bis, MMy21-MMy22, MMy23-MMy24, MMy12-MMy14, MMy12-MMy13bis, pour le diagnostic *in vitro* de l'infection d'un individu par HIV-2.

10

L'agent de polymérisation utilisé dans l'étape d'élongation du cycle est une ADN polymérase thermostable, notamment la Taq polymérase, l'ampliose de la firme Appligène ou toute ADN-polymérase thermostable pouvant être commercialisée.

D'une manière générale, le cycle de la méthode de diagnostic *in vitro* de l'invention est répété entre 30 et 40 fois.

15

La méthode de diagnostic *in vitro* de l'invention permet également, en fonction des couples d'amorces nucléotidiques utilisés, de détecter sélectivement les gènes des virus du type HIV et/ou SIV présents dans l'échantillon biologique.

Les couples d'amorces utilisables, à titre d'exemples, pour la méthode de diagnostic gène par gène sus-mentionnée de l'invention, sont les suivants :

20

- MMy1-MMy4, MMy2-MMy4, MMy1-MMy3, MMy4bis-MMy28bis pour le gène gag,
- MMy18-MMy19 pour le gène vpr,
- MMy5-MMy8, MMy6-MMy8, MMy7-MMy8, MMy5-MMy7bis, MMy6-MMy7bis, MMy26-MMy5bis, MMy8bis-MMy9bis, MMy8bis-MMy89, MMy89bis-MMy9bis pour le gène env,
- 25 MMy9-MMy11, MMy9-MMy10bis, MMy10-MMy11 pour le gène nef1,
- MMy15-MMy17, MMy15-MMy16bis, MMy16-MMy17, pour le gène vif1,
- MMy20-MMy22, MMy20-MMy21bis, MMy21-MMy22 pour vif 2,
- MMy23-MMy24 pour vpx,
- MMy12-MMy14, MMy12-MMy13bis, MMy13-MMy14 pour nef2,
- 30 MMy25-MMy27, MMy26-MMy27 pour le gène vpu,
- MMy28-MMy29bis, MMy29-MMy30bis, MMy30-MMy31bis, MMy31-MMy32bis pour le gène pol.

Toutefois, les combinaisons entre primers "S" et "AS" décrites ci-dessus ne sont pas limitatives et peuvent être variées selon le désir de l'utilisateur.

35

Les tailles des fragments nucléotidiques synthétisés à l'aide des couples d'amorces sus-mentionnés à titre d'exemples, sont indiquées sur les tableaux I à XI suivants :

(les chiffres indiqués dans les tableaux ci-dessous représentent le nombre de nucléotides des fragments synthétisés, et les "tirets" indiquent que les couples d'amorces testés ne permettent pas de caractériser les souches virales correspondantes).

40

Tableau I

45

| | gag | | gag | |
|----------|-----------|-----------|-----------|------------------|
| | MMy1-MMy3 | MMy1-MMy4 | MMy2-MMy4 | MMy4bis-MMy28bis |
| HIV1-BRU | 265 | 750 | 532 | 671 |
| HIV1-MAL | 282 | 785 | 556 | 671 |
| HIV1-ELI | 265 | 750 | 538 | 674 |
| HIV2-ROD | 354 | 845 | 544 | 663 |
| SIV | 343 | 844 | 544 | 668 |

55

EP 0 806 484 A2

Tableau II

| | env | | env | |
|----|----------|--------------|-----------|--------------|
| 5 | | MMy5-MMy7bis | MMy5-MMy8 | MMy6-MMy7bis |
| | HIV1-BRU | 480 | 953 | 330 |
| | HIV1-MAL | 471 | 944 | 321 |
| | HIV1-ELI | 471 | 941 | 321 |
| 10 | HIV2-ROD | - | - | - |
| | SIV | - | - | - |

Tableau III

| | env | | | |
|----|-----------|---------------|-----------------|------|
| | MMy7-MMy8 | MMy26-MMy5bis | MMy8bis-MMy9bis | |
| 20 | HIV1-BRU | 498 | 691 | 1038 |
| | HIV1-MAL | 498 | 691 | 1041 |
| | HIV1-ELI | 495 | 679 | 1038 |
| 25 | HIV2-ROD | - | - | - |
| | SIV | - | - | - |

Tableau IV

| | env | | |
|----|---------------|------------------|-----|
| | MMy8bis-MMy89 | MMy89bis-MMy9bis | |
| 30 | HIV1-BRU | 411 | 646 |
| | HIV1-MAL | 411 | 649 |
| | HIV1-ELI | 411 | 646 |
| 35 | HIV2-ROD | - | - |
| | SIV | - | - |

Tableau V

| | nef1 | | | |
|----|---------------|------------|-------------|-----|
| | MMy9-MMy10bis | MMy9-MMy11 | MMy10-MMy11 | |
| 45 | HIV1-BRU | 293 | 660 | 388 |
| | HIV1-MAL | 302 | 660 | 388 |
| | HIV1-ELI | 296 | 663 | 388 |
| 50 | HIV2-ROD | - | - | - |
| | SIV | - | - | - |

EP 0 806 484 A2

Tableau VI

| | nef2 | | |
|----------|----------------|-------------|-------------|
| | MMy12-MMy13bis | MMy12-MMy14 | MMy13-MMy14 |
| HIV1-BRU | - | - | - |
| HIV1-MAL | - | - | - |
| HIV1-ELI | - | - | - |
| HIV2-ROD | 400 | 792 | 415 |
| SIV | 400 | 755 | 378 |

Tableau VII

| | vif1 | | |
|----------|----------------|-------------|-------------|
| | MMy15-MMy16bis | MMy15-MMy17 | MMy16-MMy17 |
| HIV1-BRU | 333 | 603 | 293 |
| HIV1-MAL | 333 | 603 | 293 |
| HIV1-ELI | 333 | 603 | 293 |
| HIV2-ROD | - | - | - |
| SIV | - | - | - |

Tableau VIII

| | vpr | vif2 | |
|----------|-------------|----------------|-------------|
| | MMy18-MMy19 | MMy20-MMy21bis | MMy20-MMy22 |
| HIV1-BRU | 281 | - | - |
| HIV1-MAL | 281 | - | - |
| HIV1-ELI | 281 | - | - |
| HIV2-ROD | 319 | 352 | 659 |
| SIV | 308 | 352 | 656 |

Tableau IX

| | vif2 | vpx |
|----------|-------------|-------------|
| | MMy21-MMy22 | MMy23-MMy24 |
| HIV1-BRU | - | - |
| HIV1-MAL | - | - |
| HIV1-ELI | - | - |
| HIV2-ROD | 329 | 329 |
| SIV | 326 | 329 |

Tableau X

| | vpu | pol | |
|----------|-------------|-------------|----------------|
| | MMy25-MMy27 | MMy26-MMy27 | MMy28-MMy29bis |
| HIV1-BRU | 263 | 104 | 623 |
| HIV1-MAL | 263 | 101 | 584 |
| HIV1-ELI | 263 | 101 | 584 |
| HIV2-ROD | - | - | 666 |
| SIV | - | - | 712 |

Tableau XI

| | pol | pol | |
|----------|----------------|----------------|----------------|
| | MMy29-MMy30bis | MMy30-MMy31bis | MMy31-MMy32bis |
| HIV1-BRU | 742 | 869 | 826 |
| HIV1-MAL | 742 | 869 | 826 |
| HIV1-ELI | 742 | 869 | 826 |
| HIV2-ROD | 742 | 866 | 826 |
| SIV | 742 | 866 | 826 |

Il est à noter que grâce à leur disposition sur le génome, les primers servant à l'amplification peuvent être combinés de telle façon qu'ils peuvent être utilisés comme sonde, soit après marquage au 32 p par kinéation, soit pour l'utilisation dans la technique des sondes froides pour vérifier la spécificité de la bande d'amplification observée lors d'une analyse par "Southern transfert". En plus de la combinaison classique des amores pour qu'un troisième oligonucléotide puisse servir de sonde interne spécifique, il est à noter le cas particulier des gènes vif1/vpr et vif2/vpx dû au chevauchement de ces gènes, ce qui permet une détection croisée. En outre, lors d'une analyse par séquençage de l'ADN amplifié, ces oligonucléotides peuvent être utilisés comme amorce spécifique pour la DNA-polymérase permettant un double séquençage dans chaque sens, donc une double lecture des séquences, levant ainsi des ambiguïtés éventuelles d'interprétation.

L'invention a également pour objet les amores, telles que définies ci-dessus, marquées, notamment de manière radioactive ou enzymatique, ainsi que leur utilisation en tant que sondes nucléotidiques, notamment dans le cadre de la méthode de diagnostic in vitro telle que décrite ci-dessus.

L'invention a également pour objet des oligonucléotides tels que décrits ci-dessus et comportant des sucres en conformation α . De tels oligonucléotides présentent la caractéristique d'inverser le sens de la double hélice formée avec la matrice (brin du génome du virus), cette double hélice passant ainsi de l'état "S" à l'état "AS".

L'invention concerne aussi les oligonucléotides décrits ci-dessus dont certains nucléotides sont méthylés et/ou comportent un ou plusieurs atomes de soufre notamment sur les adénines. De tels oligonucléotides présentent la caractéristique d'augmenter la stabilité de la double hélice, et par conséquent de mieux s'hybrider avec le brin d'ADN à amplifier.

L'invention concerne également les oligonucléotides tels que décrits ci-dessus et se présentant sous la forme dite "de bases modifiées" comportant des nucléotides sur lesquels sont greffés de façon covalente des agents chromophores (molécules aromatiques planes telles que l'acridine orange), notamment selon la méthode décrite dans l'article de C. Hélène paru dans "la Vie des Sciences", compte-rendus, série générale, tome 4, n°1, p. 17-37. De tels oligonucléotides présentent la caractéristique d'être facilement détectables, notamment par fluorescence.

Les oligonucléotides de l'invention sont également utilisables pour la mise en oeuvre d'une méthode de diagnostic in vitro de l'infection de singes (macaque, singe de mangabeys ou singe vert) par le virus du type SIV, cette méthode reprenant les principales caractéristiques de celle décrite ci-dessus.

L'invention a également pour objet des kits de diagnostic pour la mise en oeuvre des méthodes de diagnostic in vitro sus-mentionnées. A titre d'exemple, un kit de diagnostic de la présente invention comprend :

- au moins un couple d'amorces oligonucléotidiques selon l'invention, chaque couple comprenant une amorce s'hybridant à l'un des brins de la séquence d'acide nucléique à détecter, et une amorce s'hybridant avec le brin complémentaire de ce dernier dans les conditions définies ci-dessus,
- des réactifs appropriés à la mise en œuvre du cycle d'opérations d'amplification, notamment de l'ADN polymérase, et quatre nucléotides triphosphate différents, et le milieu réactionnel dénommé "10 X buffer" décrit ci-dessus.
- 5 - une (ou plusieurs) sonde pouvant être marquée, notamment par radioactivité ou par la technique des sondes froides, capable de s'hybrider spécifiquement avec la (ou les) séquence(s) d'acides nucléiques amplifiée(s) à détecter.

10 L'invention concerne aussi l'utilisation des amorces de l'invention indiquées ci-dessus pour la mise en œuvre d'un procédé de synthèse de protéines codées par les séquences nucléotidiques amplifiées à l'aide de ces amorces.

A titre illustratif, ce procédé de synthèse de protéines comprend l'amplification de séquences nucléotidiques des génomes des virus du type HIV ou SIV (codant pour une protéine déterminée et ayant subi, le cas échéant, certaines modifications de leurs nucléotides) par mise en contact desdites séquences avec au moins un couple d'amorces selon l'invention dans les conditions décrites ci-dessus, suivie de la traduction de ces séquences ainsi amplifiées en protéines ; cette dernière étape est réalisée notamment par transformation de cellules hôtes appropriées à l'aide de vecteurs contenant lesdites séquences amplifiées, et récupération des protéines produites dans ces cellules hôtes.

15 L'invention concerne également les polypeptides issus de la traduction des séquences (ou amorces) nucléotidiques de l'invention.

20 L'invention a également pour objet l'utilisation des amorces oligonucléotidiques anti-sens en tant qu'agents antiviraux en général, notamment dans la lutte contre le SIDA, ainsi que des compositions pharmaceutiques contenant ces amorces anti-sens en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

25 L'invention concerne également les compositions immunogènes comprenant un ou plusieurs produits de traduction des séquences nucléotidiques selon l'invention, et/ou un ou plusieurs produits de traduction des séquences nucléotidiques amplifiées selon les procédés décrits ci-dessus à partir des amorces définies selon l'invention, ces produits de traduction étant associés à un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

30 L'invention concerne les anticorps dirigés contre l'un ou plusieurs des produits de traduction décrits ci-dessus (ou en d'autres termes, susceptibles de former une réaction immunologique avec un ou plusieurs produits de traduction des séquences nucléotidiques selon l'invention, ou encore un ou plusieurs produits de traduction des séquences nucléotidiques amplifiées à partir des amorces définies selon l'invention) et leur utilisation pour la mise en œuvre de méthodes de diagnostic *in vitro* de l'infection d'un individu par un virus du type HIV-1 et/ou HIV-2, ou d'un animal par au moins l'un des trois virus (HIV-1, HIV-2, SIV) selon les procédés connus de l'homme de l'Art.

35 A titre illustratif, une telle méthode de diagnostic *in vitro* selon l'invention comprend la mise en contact d'un échantillon biologique (notamment de sérum) prélevé chez un patient à l'étude, avec des anticorps selon l'invention, et la détection à l'aide de tout procédé approprié (notamment à l'aide d'anti-immunoglobulines marquées) des complexes immunologiques formés entre les antigènes des virus du type HIV ou SIV éventuellement présents dans l'échantillon biologique et lesdits anticorps.

40 L'invention a également pour objet des kits de diagnostic *in vitro* comprenant des anticorps selon l'invention et, le cas échéant, des réactifs appropriés à la mise en évidence de la réaction immunologique formée entre lesdits anticorps et les antigènes des virus HIV ou SIV.

45 L'invention vise également un procédé de préparation des polypeptides mentionnés ci-dessus, notamment ceux correspondant selon le code génétique universel aux séquences (ou amorces) nucléotidiques décrites ci-dessus, ce procédé étant caractérisé en ce que, partant de préférence de l'aminoacide C-terminal, l'on condense successivement deux à deux les aminoacyles successifs dans l'ordre requis, ou des aminoacyles et des fragments préalablement formés et contenant déjà plusieurs résidus aminoacyles dans l'ordre approprié, ou encore plusieurs fragments préalablement ainsi préparés, étant entendu que l'on aura eu soin de protéger au préalable toutes les fonctions réactives portées par ces aminoacyles ou fragment à l'exception des fonctions amine de l'un et carboxyle de l'autre ou vice-versa, qui doivent normalement intervenir dans la formation des liaisons peptidiques, notamment après activation de la fonction carboxyle, selon les méthodes connues dans la synthèse des peptides et ainsi de suite, de proche en proche, jusqu'à l'acide aminé N-terminal.

50 Par exemple, on aura recours à la technique de synthèse peptidique en solution homogène décrite par Houbenweyl dans "Méthode der Organischen Chemie" (Méthode de la Chimie Organique) éditée par E. Wunsch, vol. 15-I et II, THIEME, STUTTGART, 1974, ou à celle de synthèse peptidique en phase solide décrite par R.D. Merrifield dans "Solid Phase Peptide Synthesis" (J. AM. CHEM. SOC., 45, 2149-2154).

55 L'invention concerne également un procédé de préparation des séquences (ou amorces) nucléotidiques décrites ci-dessus, ce procédé comprenant les étapes suivantes :

- incubation de l'ADN génomique, isolé à partir d'un des virus du type HIV ou SIV sus-mentionnés, avec de l'ADNase I, puis addition d'EDTA et purification par extraction au mélange phenol/chloroforme/alcool isoamlylique (25/24/ 1) puis par l'éther,

EP 0 806 484 A2

- traitement de l'ADN ainsi extrait par de l'Eco R1 méthylase en présence de DTT, et purification par extraction telle que décrite ci-dessus,
- incubation de l'ADN ainsi purifié avec les 4 désoxynucléotides triphosphates dATP, dCTP, dGTP, et dTTP en présence de T4 ADN polymérase et d'ADN ligase de E. coli, puis purification selon la méthode décrite ci-dessus,
- 5 - le clonage des acides nucléiques ainsi obtenus dans un vecteur approprié et la récupération de l'acide nucléique recherché à l'aide d'une sonde appropriée.

Un procédé de préparation particulièrement avantageux des séquences nucléotidiques de l'invention comprend les étapes suivantes :

10

- la synthèse d'ADN en utilisant la méthode automatisée des β-cyanethyl phosphoramidite décrite dans Bioorganic Chemistry 4; 274-325 (1986),
- le clonage des acides nucléiques ainsi obtenus dans un vecteur approprié et la récupération de l'acide nucléique par hybridation avec une sonde appropriée.

15

Un autre procédé de préparation des séquences nucléotidiques de l'invention comprend les étapes suivantes :

20

- l'assemblage d'oligonucléotides synthétisés chimiquement, pourvus à leurs extrémités de sites de restriction différents, dont les séquences sont compatibles avec l'enchaînement en acides aminés du polypeptide naturel selon le principe décrit dans Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80; 7461-7465, (1983),
- le clonage des acides nucléiques ainsi obtenus dans un vecteur approprié et la récupération de l'acide nucléique recherché par hybridation avec une sonde appropriée.

Revendications

25

1. Oligonucléotide utilisable en tant qu'amorce pour l'amplification de séquences d'acide nucléique, caractérisé en ce que sa séquence est choisie parmi les séquences conservées et spécifiques des gènes gag, vpr, pol ou vpx des virus HIV-1 Bru, HIV-1 Mal, et HIV-1 Eli HIV-2 ROD et SIV MAC, ou dans les gènes nef2, vif2 et vpx des virus HIV-2 ROD et SIV MAC, ou parmi les séquences complémentaires de ces dernières.

30

2. Oligonucléotide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il contient une séquence conservée et spécifique d'un gène choisi parmi les gènes gag, vpr, pol ou vpx des virus HIV-1 Bru, ou HIV-1 Mal, ou HIV-1, Eli HIV-2 ROD et SIV MAC ou dans les gènes nef2, vif2 et vpx des virus HIV-2 ROD et SIV MAC et des nucléotides supplémentaires, ou contient une séquence nucléotidique complémentaire de l'une de ces dernières séquences, étant entendu que les nucléotides supplémentaires éventuels qui "débordent" la séquence nucléotidique conservée spécifique du gène en question, du côté des extrémités 3' ou 5', coïncident de préférence avec ceux qui se trouvent placés en deçà des extrémités 3' ou 5' correspondant au sein même de la séquence complète des gènes des virus du type HIV-1, HIV-2 ou SIV susmentionnés.

35

3. Oligonucléotide caractérisé en ce que sa séquence est modifiée par rapport à la séquence nucléotidique d'un oligonucléotide selon la revendication 1 ou 2, et en ce qu'elle s'hybride, à une température de 60°C ± 1°C susdites, avec ledit oligonucléotide selon la revendication 1 ou 2.

40

4. Séquences selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, contenues dans le gène gag des virus HIV-1 Bru, HIV-1 Mal, HIV-1 Eli, HIV-2 ROD et SIV MAC, ces séquences étant caractérisées par les enchaînements nucléotidiques suivants :

50

55

EP 0 806 484 A2

MMy1: TGG CGC CCG AAC AGG GAC
... .T.
5 S, 636-653, 635-652, 636-653, 859-876, 834-851

MMy2 : GGC CAG GGG GAA AGA AAA A
... .C. .C.
10A.
S, 854-872, 864-888, 848-872, 1160-1184, 1124-
1148

15 MMy3 : TGC CCA TAC AAA ATG TTT TA
... .C.. T.T
AS, 900-881, 916-897, 900-881, 1212-1193, 1176-
20 1157

MMy4 : TGC ATG GCT GCT TGA TG
... .AC ..G ..
25 AS, 1385-1369, 1419-1403, 1385-1369, 1703-
1687, 1667-1651

MMy4B: CTT TGC ATG GCT GCT TGA TG
..CAC
30 AS, 1388-1369, 1421-1403, 1388-1369, 1706-1687,
1670-1651,

35 MMy4Bbis: CAT CAA GCA GCC ATG CAA AG
..C ..GTG ..
S, 1369-1388, 1403-1421, 1369-1388,
40 1687-1706, 1651-1670,

45 MMy28 : AGG GCT GTT GGA AAT GTG G
...G.
S, 2021-2039, 2055-2073, 2024-2042, 2329-2349,
2299-2318,

50

55

MMy28bis : CCA CAT TTC CAG CAT CCC T
5 G
 C
AS, 2039-2021, 2073-2055, 2042-2024, 2349-2329,
10 2318-2299.

15 5. Séquences selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, contenues dans le gène *ypr* des virus HIV-1 Bru, HIV-1 Mal, HIV-1 Eli, HIV-2 ROD et SIV MAC, ces séquences étant caractérisées par les enchaînements nucléotidiques suivants :

20 MMy18 : GAT AGA TGG AAC AAG CCC CAG
S, 5590-5610, 5585-5605, 5554-5574, 6233-
6296, 6147-6170,
MMy19 : TCC ATT TCT TGC TCT CCT CTG T
25 AS, 5870-5849, 5865-5844, 5834-5813, 6551-
6531, 6454-6431.

30 6. Séquences selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, contenues dans le gène *pol* des virus HIV-1 Bru, HIV-1 Mal, HIV-1 Eli, HIV-2 ROD et SIV MAC, ces séquences étant caractérisées par les enchaînements nucléotidiques suivants :

35 MMy29: TAA AGC CAG GAA TGG ATG GCC CAA
... A. . .
S, 2620-2643, 2615-2638, 2584-2607, 2971-
40 2994, 2887-3010
MMy29 bis: TTG GGC CAT CCA TTC CTG GCT TTA
... . T.
45 AS, 2643-2620, 2638-2615, 2607-2584, 2994-
2971, 3010-2887,
MMy30: TGG ACT GTC AAT GAC ATA CAG AA
50 T
S, 3339-3361, 3334-3356, 3303-3325, 3690-
3712, 3606-3628,

MMy30bis :TTC TGT ATG TCA TTG ACA GTC CA
5
AS, 3361-3339, 3356-3334, 3325-3303, 3712-
3690, 3628-3606,
MMy31: CAT GGG TAC CAG CAC ACA AAG G
10 S, 4186-4207, 4181-4202, 4150-4171, 4534-
4555, 4450-4471,
MMy31bis :CCT TTG TGT GCT GGT ACC CAT G
15 AS, 4207-4186, 4202-4181, 4171-4150, 4555-
4534, 4471-4450
MMy32: TGG AAA GGT GAA GGG GCA GT
20
S, 4992-5011, 4987-5006, 4956-4975, - 5340-
5359, 5256-5275,
MMy32bis: ACT GCC CCT TCA CCT TTC CA
25
...
30 AS, 5011-4992, 5006-4987, 4975-4956, 5359-
5340, 5275-5256.

35 7. Séquences selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, contenues dans le gène vpu des virus HIV-1 Bru, HIV-1 Mal, HIV-1 Eli, HIV-2 ROD et SIV MAC, ces séquences étant caractérisées par les enchaînements nucléotidiques suivants :

40 MMy25 : GTA AGT AGT ACA TGT AAT GCA ACC T
S, 6081-6105, 6076-6100, 6045-6069,
MMy26 : AGC AGA AGA CAG TGG CCA TGA GAG
45 S, 6240-6263, 6238-6261, 6207-6230,
MMy27 : ACT ACA GAT CAT CAA TAT CCC AA
AS, 6343-6321, 6338-6316, 6307-6285.

50 8. Séquences selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, contenues dans le gène nef2 des virus HIV-2 ROD et SIV MAC, ces séquences étant caractérisées par les enchaînements nucléotidiques suivants :

EP 0 806 484 A2

MMy12 : AGA GAC TCT TGC GGG CGC GTG
S, 9165-9185, 9139-9159,
5 MMy13 : ATA TAC TTA GAA AAG GAA GAA GG
S, 9542-9564, 9516-9538,
MMy13bis: CCT TCT TCC TTT TCT AAG TAT AT
10 AS, 9564-9542, 9538-9516,
MMy14 : AGC TGA GAC AGC AGG GAC TTT CCA
AS, 9956-9933, 9893-9870.
15

9. Séquences selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, contenues dans le gène vif2 des virus HIV-2 ROD et SIV MAC, ces séquences étant caractérisées par les enchaînements nucléotidiques suivants :

20 MMy20 : TAT GGA GGA GGA AAA GAG ATG GAT AGT
S, 5424-5450, 5340-5366,
25 MMy21 : TAG CAC TTA TTT CCC TTG CTT T
S, 5754-5775, 5670-5691,
MMy21bis: AAA GCA AGG GAA ATA AGT GCT A
30 AS, 5775-5754, 5691-5670,
MMy22 : CCC TTG TTC ATC ATG CCA GTA T
AS, 6082-6061, 5995-5974.

35

10. Séquences selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, contenues dans le gène vpx des virus HIV-2 ROD et SIV MAC, ces séquences étant caractérisées par les enchaînements nucléotidiques suivants :

40 MMy23 : ATG TCA GAT CCC AGG GAG A
S, 5900-5918, 5813-5831,
45 MMy24 : CCT GGA GGG GGA GGA GGA GGA
AS, 6228-6208, 6141, 6121.

50

11. Procédé d'amplification génique de séquences nucléiques de virus du type HIV-1, HIV-2 ou SIV réalisé à partir d'un échantillon biologique, ce procédé comprenant principalement les étapes suivantes :

55 - une étape d'extraction de l'acide nucléique à détecter appartenant au génome du virus du type HIV-1, HIV-2 ou SIV, éventuellement présent dans l'échantillon biologique susmentionné, et, le cas échéant, une étape de traitement à l'aide d'une transcriptase inverse dudit acide nucléique si ce dernier est sous forme d'ARN,
- un cycle comprenant les étapes suivantes :

EP 0 806 484 A2

5 - dénaturation de l'acide nucléique double brin à détecter, ce qui conduit à la formation d'un acide nucléique simple brin,

10 - hybridation de chacun des brins d'acide nucléique, obtenus lors de l'étape de dénaturation précédente, avec au moins un oligonucléotide utilisé comme amorce, selon l'une des revendications 1 à 10, par mise en contact des brins susmentionnés avec au moins un couple d'amorces susmentionnées,

15 - formation à partir des amorces des ADN complémentaires aux brins sur lesquels elles sont hybridées en présence d'une ADN polymérase et de quatre nucléosides triphosphate (dNTP) différents, ce qui conduit à la formation d'un plus grand nombre d'acides nucléiques double brin à détecter qu'à l'étape de dénaturation précédente,

20 ce cycle étant répété un nombre de fois déterminé pour obtenir ladite séquence nucléique à détecter éventuellement présente dans l'échantillon biologique dans une proportion suffisante pour permettre sa détection,

25 - une étape de détection de la présence éventuelle de l'acide nucléique appartenant au génome du virus du type HIV-1, HIV-2 ou SIV dans l'échantillon biologique.

12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que l'étape d'extraction de l'ADN viral comprend les étapes suivantes :

20 - suspension du culot cellulaire dans 0,5 ml d'eau pyrolyisée dans un Potter gros piston,

25 - broyage des cellules dit par "aller et retour",

30 - adjonction de Triton X100 pour 1 concentration finale de 0,1 %,

35 - dénaturation à la chaleur durant 15 à 25 minutes à 100°C,

40 - centrifugation courte pour n'éliminer que les débris cellulaires,

45 - précipitation de l'ADN durant la nuit à -20°C par adjonction de 2,5 volumes d'éthanol absolu et de 10 % du volume final d'acétate de sodium 3 Molaires.

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que l'étape de rétro-transcription de l'ARN viral comprend les étapes suivantes :

30 - 10 µg d'ARN extrait resuspendu dans de l'eau est mis en présence du couple d'amorces à la concentration de 0,8 µM chacun, dans un volume final de 40 µl, l'ensemble est dénaturé à 100°C durant 10 minutes puis plongé dans de l'eau glacée,

35 - l'on rajoute 10 µl du mélange suivant : 5 µl du tampon "10 X buffer" (comportant lorsqu'il est dilué au 1/10° : Tis-HCl, pH = 8,9 : 50mM ; (NH₄)₂ SO₄ : 15 mM ; MgCl₂ : 5 mM ; β-mercaptop-éthanol : 10 mM ; gélatine : 0,25 mg/ml) + 1 unité de reverse-transcriptase + 1 unité de Taq-polymérase + 1 µl du mélange des 4 dNTP à 25 mM chacun + de l'eau Q.S.P. 10 µl, la fabrication de l'ADNc se fait par action de la reverse transcriptase à 42°C durant 13 minutes, puis on chauffe à 95°C durant 3 minutes pour détruire la reverse-transcriptase.

14. Procédé selon l'une des revendications 11 à 13, caractérisé en ce que l'étape de dénaturation est réalisée en présence du (ou des) couple(s) d'amorces selon l'une quelconque des revendications 1 à 10.

15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il est réalisé dans les conditions suivantes :

45 - pour l'étape d'hybridation, les amorces (1 µl d'une solution à 40 µmolaire de chaque amorce) sont mises en présence de l'ADN-matrice (100 à 300 ng) pour la première étape de dénaturation-réassociation, puis on chauffe, durant 10 minutes à 100°C puis on plonge les tubes contenant ce mélange d'ADN-matrice et d'amorces dans de l'eau contenant de la glace les amorces étant utilisées à une concentration finale dans l'étape d'amplification qui suit de 0,8 µM chaque ;

50 - pour l'étape d'amplification, on ajoute au milieu précédent les 4 dNTP chacun étant utilisé à 0,5 µmolaire en solution finale (50 µl), et une unité de Taq-polymérase pour un milieu réactionnel de 50 µl ; cette étape étant réalisée dans le tampon d'amplification désigné sous le nom de "10 X buffer" dont la composition est indiquée dans la revendication 14.

16. Application du procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 15 au diagnostic *in vitro* de l'infection d'un individu par un virus du type HIV-1, HIV-2 ou SIV ou d'un animal par un virus du type HIV-1, HIV-2 ou SIV.

17. Procédé d'expression de protéines codées par les séquences nucléotidiques du virus du type HIV-1, HIV-2 ou SIV, amplifiables au moyen des oligonucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 comprenant les étapes de

EP 0 806 484 A2

- mise en contact d'au moins un couple d'oligonucléotides spécifiques d'un gène choisi parmi les gènes gag, pol, vpr, vpu, nef2, vif2 ou vpx d'un rétrovirus de type HIV-1, HIV-2 ou SIV, ces oligonucléotides répondant à des séquences selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, avec des séquences nucléotidiques issues du génome d'un virus de type HIV-1, HIV-2 ou SIV, dans des conditions permettant l'hybridation de ces séquences avec les oligonucléotides,

5 - amplification des séquences nucléotidiques contenues dans des gènes gag, pol, vpr, vpu, nef2, vif2 ou vpx de rétrovirus de type HIV-1, HIV-2 ou SIV, à partir des susdits oligonucléotides selon le procédé de l'une quelconque des revendications 11 à 15,

10 - récupération et traduction des séquences ainsi amplifiées pour obtenir de séquences de protéines.

18. Compositions immunogènes comprenant un (ou plusieurs) produit(s) de traduction des oligonucléotides répondant aux séquences nucléotidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, et/ou un (ou plusieurs) produit(s) de traduction des séquences nucléotidiques contenues dans l'un des gènes gag, pol, vpr, vpu, nef2, vif2 ou vpx de rétrovirus du type HIV-1, HIV-2 ou SIV amplifiées par le procédé selon l'une des revendications 11 à 15, après hybridation avec un couple d'oligonucléotides choisis parmi les oligonucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, spécifiques d'un gène d'un virus du type HIV-1, HIV-2 ou SIV choisi parmi les gènes gag, pol, vpr, vpu, nef2, vif2 ou vpx et/ou un (ou plusieurs) produit(s) d'expression obtenus par le procédé selon la revendication 21.

19. Kit pour la mise en oeuvre d'une méthode selon l'une des revendications 11 à 15 comprenant :

25 - au moins un couple d'amorces oligonucléotidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 10,

- des réactifs appropriés à la mise en oeuvre du cycle d'opérations d'amplification, notamment de l'ADN polymérase, et quatre nucléotides triphosphate différents,

20. le tampon "10 X buffer" tel que décrit dans la revendication 9,

25 - une (ou plusieurs) sonde(s), pouvant être marquée(s), capable(s) de s'hybrider avec la (ou les) séquence(s) d'acide nucléique amplifiée(s) à détecter.

20. Composition pour le traitement de maladies virales, notamment du SIDA, comprenant au moins une séquence nucléotidique anti-sens selon l'une des revendications 1 à 10 en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

21. Anticorps susceptibles de former une réaction immunologique avec les produits de traduction des oligonucléotides répondant aux séquences nucléotidiques selon l'une des revendications 1 à 10, et/ou un (ou plusieurs) produit(s) de traduction des séquences nucléotidiques contenues dans l'un des gènes gag, pol, vpr, vpu, nef2, vif2 ou vpx de virus du type HIV-1, HIV-2 ou SIV amplifiées par la méthode selon l'une quelconque des revendications 4 à 15 après hybridation avec un quelconque oligonucléotide choisi parmi les oligonucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, spécifiques d'un gène d'un virus du type HIV-1 choisi parmi les gènes gag, pol, vpr, vpu, nef2, vif2 ou vpx et/ou un (ou plusieurs) produit(s) d'expression obtenu(s) par le procédé selon la revendication 17.

22. Méthode de diagnostic *in vitro* de l'infection d'un individu ou d'un animal par un virus du type HIV-1, HIV-2 ou SIV comprenant la mise en contact d'un échantillon biologique (notamment de sérum) prélevé chez un patient à l'étude, avec des anticorps selon la revendication 21, et la détection des complexes immunologiques formés entre les antigènes des virus du type HIV-1, HIV-2 ou SIV éventuellement présents dans l'échantillon biologique et lesdits anticorps.

23. Kit pour la mise en oeuvre d'une méthode selon la revendication 22, comprenant des anticorps selon la revendication 21 et, le cas échéant, des réactifs appropriés pour la mise en évidence de la réaction immunologique formée entre lesdits anticorps et les antigènes des virus HIV-1, HIV-2 ou SIV.

24. Solution tampon ("10 x buffer") utilisable dans un procédé d'amplification de séquences d'acide nucléique au moyen d'oligonucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'il comprend, lorsqu'il est dilué en 1/10ème :

55 - Tris - HCl, pH 8,9 ; 50 mM,

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 15 mM,

- MgCl_2 ; 5 mM

- β -mercapto-éthanol ; 10 mM

- gélatine ; 0,25 mg/ml.